

麻痺性貝毒の精密定量法の開発と合成誘導体を用いた新規研究素材の調製

著者	渡邊 龍一
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第731号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60187

氏 名(本籍) わた なべ りゅう いち
渡 邊 龍 一

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農 第 7 3 1 号

学位授与年月日 平 成 20 年 3 月 6 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 麻痺性貝毒の精密定量法の開発と合成誘導体を用いた新規研究素材の調製

論文審査委員	(主 査)	教 授	大 島 泰 克
	(副 査)	教 授	山 下 ま り
		教 授	村 本 光 二

毒を産生する渦鞭毛藻を摂餌することで二枚貝は毒化し、食中毒の原因となる¹⁾。二枚貝に取り込まれた毒は、比毒性の異なる多成分混合系として存在する (Fig. 1)。この毒を化学分析するには、標準品が必要であり、個々の毒について正確な毒濃度と比毒性情報が要求される。毒は吸湿性が非常に高く、不安定のため、重量測定による定量が不可能である。そこで過去には、元素分析を利用した窒素含量を指標にして毒の濃度決定を行っていた。この方法は、多量の試料を消費すること、酸溶液中のアンモニア等窒素不純物の影響を受けやすい等の問題を含んでいることから、非破壊的手法で簡便かつ正確な定量法が求められている。

一方、多成分の毒が、二枚貝体内でどのように生体高分子と関わっているかを知ることとは毒性発現機構だけではなく、蓄積、代謝などの毒の生体内での動きを理解する上で重要であるが、その研究は立ち後れている。現在、神経筋細胞の受容体への結合や二枚貝における毒の動態解明には、トリチウム標識毒による結合試験や蛍光化 HPLC 法²⁾などが使われている。しかし、高感度検出に適したトリチウム標識毒も、毒との結合が不安定なため、寿命の短さや使用条件が限定されるなどの問題を抱えている。また、毒に対する抗体を産生するために人工抗原が作られているが、毒の高分子への結合に非特異的な反応が使われているため、性能の良い抗体ができていない。従って、毒の動態解明など新しい研究の展開には、化学的に十分にコントロールされた反応で誘導した多数の新規研究試薬の創出が強く求められている。

以上のような現状を踏まえ、本研究では、核磁気共鳴装置を利用し、内部標準を用いた麻痺性貝毒の精密定量法を開発した。また、毒を化学的に変換した鍵化合物を合成し、これらを導入したアフィニティークロマトグラフ素材など、毒の自然界における動態解明に役立つ研究素材の開発を行った。

第一章 内部標準法による NMR 定量法の開発

核磁気共鳴 (NMR) は、非破壊かつ溶液状態で測定できる利点を有し、ある一定の条件を整えれば、プロトン毎のシグナル応答が均等となり、異なる化合物間での濃度比較が可能となる。これまで、カフェインを外部標準とする麻痺性貝毒の NMR 定量法が提案されている³⁾。軽水を測定溶媒とし、溶媒シグナルを事前飽和させて、除去するこの測定法には、試料管の内径に由来する誤差や磁場の不安定さが測定を難しくするなどの問題点がある。これらの問題を解決するために、重水素化溶媒を用いて感度の上昇と純度検定に用いることのできる内部標準を用いた NMR 定量法を考案し、その有効性を検証した。

測定条件と試料調製

NMR 装置は、INOVA600 (測定周波数；600 MHz, Varian) を用い、水素核観測用コイルが他核観測用コイルよりも内側に配置された ‘indirect probe’ を装着して測定した。測定にあたり、磁場の均質性の指標として、シグナルの形状の対称性と HOD シグナルの 50% 半値幅が 2.5 Hz 未満であることを確認した。試料管は、内径 5 mm の標準タイプの NMR チューブ（草野科学製作所）とした。溶媒は、99.96% atomD の重水溶媒（和光純薬工業）に、麻痺性貝毒を安定に保つために、4% の重酢酸 (acetic- d_3 acid- d , 99.5% atomD, Sigma-Aldrich) を加えたものを基本として、一定量の内部標準試薬を加えて作成した。秤量あるいは凍結乾燥した重量未知の試料をこの溶媒に溶かし、測定に供した。

第一節 測定条件の最適化

^1H NMR の測定は、水素核の磁化回復に必要な時間において、パルス照射し、その後生ずる自由誘導減衰 (FID) を一定時間検出する (Fig. 2)。取得した FID は、コンピュータによるフーリエ変換により、周波数軸に対するシグナル強度に変換される。この時、位相補正や積分分割といったデータ処理を施し、定量に必要な各プロトンの積分値が得られる。これら各段階の操作が最終的な積分値の定量性に影響を与えるので、データ取得（待ち時間、パルス幅、データ取得時間、積算回数）とその後のデータ加工とに分けて各因子の影響を検討した。なお、条件設定の実験には、重量法で濃度決定が可能な L-アルギニン（麻痺性貝毒のモデル化合物として用いた）。

データ取得において、十分な待ち時間をとらないと、緩和時間（水素核が磁化回復するのに要する時間 T_1 ）の異なるプロトンの定量性が異なってくる。麻痺性貝毒の GTX5、GTX6、dcGTX2/3 をモデルとして、 T_1 を反復磁化回復法により求めた結果、最長で 2.1 秒、最短で 0.4 秒であった (Table 1)。従って、毒の水素核が完全緩和するのに十分な時間は、 $5T_1$ である 11 秒と見積もった。この条件で、アルギニン（最長 T_1 2.4 秒）を測定したところ、十分な磁化回復を示し (Fig. 3)、全水素核の積分値の相対標準偏差は 0.8% rsd と良好であった。さらに、最適なパルス幅とデータ取得時間、積算回数を検討した結果、それぞれ、 90° パルス (Fig. 4)、2.2 秒 (Fig. 5)、64 回が最適であった。この条件での測定所要時間は 14 分であり、短時間で測定が可能であった。

次に、データ処理因子として、位相補正とベースライン処理、積分分割、window 関数処理について検討した。位相補正の客観性を向上させるため、パルス照射後の遅延時間 (rof2) とデータ取得前の遅延時間 (alfa) を最適化することで、周波数に依存する 1 次位相補正の必要性を無くした (Fig. 6)。ベースライン補正は、通常の単項式処理とした。基本的に ^{13}C サテライトシグナルを含めない積分分割とし、window 関数はいずれも用いないこととした。また、HDO シグナルを照射した NOESY1D を調べた結果、この照射は分子間 NOE、ひいては定量値に影響ないことが確認された。最終的に決定した測

定条件を Table 2 にまとめて示す。

第二節 内部標準の検討と分析精度・精確さ

内部標準として重酢酸中の残存プロトン (CHD_2COOD) シグナルが使用できることが明らかになったが、麻痺性貝毒の精製に用いる酢酸が影響することが明らかになったので、代わりにプロピオン酸とジメチルホルムアミド、メタノール、*tert*-ブタノールについて検討した (Fig. 7)。麻痺性貝毒のシグナルと重複しないこと、適当な緩和時間 (2.2 秒) を持つことから、*tert*-ブタノールを採用した。重量濃度とアルギニンのプロトンから外挿した濃度はよく一致した。試料濃度 $[C_A]$ は、測定対象と内部標準物質それぞれの 1 水素核あたりの積分値 (I_A/N_A) と (I_S/N_S) を求め、式 $[C_A] = (I_A/N_A)/(I_S/N_S) \times [C_S]$ から算出した。 $[C_S]$ は内部標準物質の 1 水素核あたりの濃度とした⁴⁾。

L-アルギニンの希釈列溶液 (0.02 - 9.53 mM) を作成して定量したところ、良好な直線性を示した (Fig. 8)。実際の定量測定である積分値一点からの逆推定における濃度の標準偏差は、 ± 0.02 mM と良好であった。また、定量限界を 5%rsd と仮定したとき、累乗近似式から 0.16 mM であった (Fig. 9)。このことから、実際の測定における最低濃度をサキシトキシン二酢酸塩 (MW; 419) で計算すると、溶液 1 mL あたり 67 μg という極微量でも十分に定量できることが判明した。また、10 日間の繰り返し測定においても、1%rsd 未満と良好な再現性を示した (Fig. 10)。

第三節 麻痺性貝毒の濃度測定

まず、標準溶液がなく、比毒性情報もない GTX6 の濃度決定を行い、その溶液について毒性試験を実施して比毒性を決定した。孤立している 5 プロトンの積分値 (Fig. 11) を平均して濃度を求め、GTX6 の比毒性は 105 $\text{MU}/\mu\text{mol}$ となった。同時に GTX5 の濃度について求め、約 20 年前に元素分析法で決定した標準液と比較したところ、後者が 10% 程度過大評価していたことが判明した。また、混合物でも定量が可能かどうか dcGTX2/3 について調べ、dcGTX2 濃度を H-10 β から求め、dcGTX3 は 4.15 ppm 付近の両異性体の 10 α が重なっているシグナルを利用して (Fig. 11)、dcGTX2 の値を除いた値から求めることができた。さらに、次章で述べる合成誘導体 CET-STX、HS-dcSTX、HS-dcGTX2/3 の反応収率などを調査するために必須の標準液を調製し、濃度を決定した (Table 3)。

第二章 麻痺性貝毒の合成誘導体を用いた新規研究素材の開発

麻痺性貝毒を化学的に誘導した鍵化合物を調製し、それを固相担体やタンパク質等と結合させ、新規研究素材の開発を試みた。修飾部位として、麻痺性貝毒の構造的特徴、特にナトリウムチャンネルへの結合の障害とならず、結果としてマウス毒性にも影響しないことが予想される C11 位と C13 位を選択した。それぞれの部位にカルボン酸を高収

率で導入する反応条件を検討し、これを鍵化合物としてさらに高分子へ導入することによって、研究素材として有用な新規誘導体の開発を行った。

第一節 麻痺性貝毒誘導体の調製

毒の誘導体化に先立ち、原料毒の確保を行った。オーストラリア産の淡水産ラン藻 *Anabaena circinalis* を 50 L 規模で約 1 か月培養したのち、収穫した。収穫時に、ラン藻細胞と培地とに分け、それぞれを種々のクロマトグラフィーに供して原料となる C1/2 と GTX2/3 を得た。まず、GTX2/3 を 30 mM メルカプトプロピオン酸を含むリン酸緩衝液中 (pH 7.4)、70°C、30 分反応させ、収率 40% で CET-STX (11-(2-carboxyethylthio)-saxitoxin) を得た。C1/2 は中性緩衝液中の加熱で 13 位側鎖を加水分解したのち (収率 40%)、11 位硫酸エステル基をメルカプトエタノールによって還元的に脱離させ (収率 90%)、dcSTX へと導いた。それに無水コハク酸を作用させ、収率 30% で HS-dcSTX (13-*O*-hemisuccinyldecarbamoysaxitoxin) を得た。また、dcGTX2/3 に無水コハク酸を作用させ、収率 70% で HS-dcGTX2/3 (13-*O*-hemisuccinyldecarbamoylgonyautoxin 2/3) を調製した。構造解析の結果、13 位水素の低磁場シフトと HMBC において 13 位水素からカルボニル炭素への相関が認められたことから、コハク酸が 13 位に導入されたことを確認した (Fig. 12)。

第二節 麻痺性貝毒を導入したアフィニティーゲルの調製とその性能評価

次に、カルボン酸導入誘導体を固相担体に結合させ、アフィニティーゲルを合成することとした。その調製計画を Fig. 13 に示す。まず、各誘導体の固相担体への効率的な導入反応を検討した。CET-STX、HS-dcSTX、HS-dcGTX2/3 についての検討結果を Table 4-6 に示す。反応溶媒に水を用いた条件では、EDC の加水分解による pH 低下が反応中に起きていることが判明した。そこで、緩衝液によって、pH を制御することで、この問題の解決を図ったところ、いずれの誘導体においても、大幅に、反応収率が向上した (Table 4)。最後に、これらの毒を導入したゲルに多数残っている未反応のアミノ基を *N*-アセチル化した。その遮蔽効果を酸性タンパク質である BSA を使って確認した (Fig. 14)。以上より、毒を導入したアフィニティーゲル 3 種を初めて調製することに成功した (Fig. 15)。

これらアフィニティーゲルが実際に、毒と相互作用を有するタンパク質の探索に使用できるか、既知の麻痺性貝毒結合タンパク質を含むヒガンフグ血漿⁵⁾とウシガエル血漿⁶⁾を用いて評価した。STX-アフィニティーゲルにヒガンフグ血漿を供すると、そこに含まれているサキシトキシン-テトロドトキシン結合タンパク質が、1000 mM NaCl を含むトリス緩衝液区に溶出した (Fig.16)。このフラクションの結合活性をトリチウム標識サキシトキシンで調べたところ、156 pmol/mg protein の活性が確認され、このアフィニ

ティーゲルが結合タンパク質の濃縮に有効であることを示すことができた。

続いて、STX 結合タンパクであるサキシフィリンを含むことが知られるウシガエル血漿を使い、STX-および dcSTX-アフィニティーゲルの性能を調べた。その結果、STX-アフィニティーゲルでは結合タンパク質らしきバンドは検出できなかったのに対し、dcSTX-アフィニティーゲルでは 50 mM NaCl 溶出区に目的のタンパク質に相当するバンドが検出された。サキシフィリンは 11 位に硫酸エステル基を有する GTX2/3 には親和性を示さないことが知られており、今回の実験もこの特性を反映したものと思われる。構造の異なる多種類のゲルを使うことで、より網羅的な探索が可能になることを示した実例であるとともに、サキシフィリン以外の新規結合タンパク質の存在を示唆する結果が得られた。

第三節 酵素免疫測定法の開発の試み

麻痺性貝毒に特異的な抗体の作成と ELISA 法の開発が多くの研究者により試みられている。そこでは、毒をホルムアルデヒド存在下で、キャリアタンパク質やペルオキシダーゼと反応させている。簡便なこの方法で、ある程度の結果が得られているが、毒とタンパク質との結合様式が不明であり、改良の余地が少ない。本章で調製した毒誘導体を使えば、タンパク質との結合部位を限定し、構造をコントロールした形で人工抗原および酵素標識毒が調製できる。

そこで、麻痺性貝毒誘導体 HS-dcSTX を鍵化合物とし、HS-dcSTX を EDC と NHS 存在下、キャリアタンパク質である BSA とヘモシアニン (KLH) それぞれへと結合させ、人工抗原を得た。タンパク質 1 分子あたりの結合量は、dcSTX-KLH: 2.7 nmol/mg protein, dcSTX-BSA: 7.6 nmol/mg protein であった。これら人工抗原を大阪公衆衛生研究所に送り、マウスの免疫、モノクローナル抗体の調製を依頼した。その結果、クローニングされた抗体は、研究所で GTX2/3 を用いて作製された抗体と比較し、反応性は 1/10 であり、遊離の麻痺性貝毒には反応性を示さなかった。今後、毒の毒導入量や免疫の仕方を検討することで、従来とは認識能の異なる抗体が得られるものと考えられる。

次に、HS-dcSTX を使い、毒標識酵素の合成を試みた。アミノ基を導入したペルオキシダーゼと縮合剤存在下で反応させ、調製方法を種々検討した結果、酵素 1 mg あたり 2 nmol の毒を導入することができた。これが酵素活性を保持していることを確認はしており、抗体に対する毒との競合性を今後検討する予定である。

また、HS-dcSTX を、DMSO 中、EDC と NHS 存在下、収率 70% でジアミンを固定した樹脂に結合させることができた。これを切り出すことにより、アミノ基を導入した毒が得られ、新たな鍵化合物として有用誘導体作成に利用できることが期待される。

総括

麻痺性貝毒およびその合成誘導体の量を溶液状態で、安定に、かつ非破壊的に測定する NMR 定量法を開発した。パルス照射後から FID 取得開始までの時間などデータ取得に関する各因子および位相補正などデータ処理条件を最適化した。また、内部標準物質として *tert*-butanol が最適であることを明らかにした。この方法は、0.02 – 9.53 mM の間で直線性があり、定量限界 (5%rsd 時) は 0.16 mM と十分に低く、14 分で測定できることから、極めて実用性が高い。実際に、麻痺性貝毒の数成分について濃度決定を行ったように、今後、標準液等の調製等の際に多用されることが期待される。

次に、麻痺性貝毒から化学的に誘導して、新規研究素材の開発を行った。鍵化合物として毒の 11 位と 13 位にカルボン酸を導入した誘導体 3 種類 (CET-STX, HS-dcSTX, HS-dcGTX2/3) を高収率で合成する方法を開発した。これら誘導体をアミノ基を有するアガロースゲルへ高収率で導入し、未反応のアミノ基をアセチル化して遮蔽することにより、毒に親和性を持つ高分子を探索、濃縮するアフィニティーゲルを初めて完成させた。既知の毒結合タンパク質を含む試料を用いて十分に機能することを確認し、安定性もあることから、今後、新しい研究展開に活用されることが期待される。

さらに、これら鍵化合物を利用して、タンパク質に結合させた人工抗原および酵素標識毒を試作し、汎用性の高い試薬であることを明らかにした。

References

1. Bricelj, V.M., and Shumway, S.E., (1998) *Reviews in fisheries science*, **6**, 315-383
2. Oshima, Y., In: *Manual on harmful marine microalgae*, 81-94. (Hallegraff, D.E., Anderson, D. M., and Cembella, A.D., Eds.) IOC manuals and guides No.33, UNESCO (1995)
3. Burton, I. W., Quilliam, M.A., and Walter, J.A., (2005) *Anal. Chem.* **77**, 3123-3131
4. Malz, F. and Jacke, H., (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 813-823
5. Yotsu-Yamashita, M., Sugimoto, A., Terakawa, T., Shoji, Y., Miyazawa, T., and Yasumoto, T., (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5637-5946
6. Mahar, J., Lukacs, G.L., Li, Y., Hall, S., and Moczydlowski, E.G., (1991) *Toxicon*, **29**, 53-71

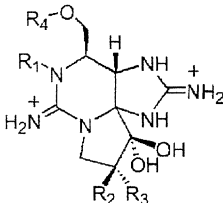
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ : -CONH ₂	R ₄ ': -CONHSO ₃ ⁻	R ₄ ': -OH
		H	H	H	STX (2483)	GTX5 (160)	dcSTX (1274)
		OH	H	H	neoSTX (2295)	GTX6 (180)	dcneoSTX (33)
		OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX1 (2468)	C3 (33)	dcGTX1 (1500)
		H	H	OSO ₃ ⁻	GTX2 (892)	C1 (15)	dcGTX2 (1617)
		H	OSO ₃ ⁻	H	GTX3 (1584)	C2 (239)	dcGTX3 (1872)
		OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX4 (1803)	C4 (143)	dcGTX4 (1080)

Figure 1. Structures and specific toxicities of the major paralytic shellfish poisoning toxins.

Values in parentheses indicate specific toxicities in MU/μmole.

One mouse unit (MU) was defined as the amount of toxin required to kill a mouse (20 g) at 15 min by intraperitoneal injection. STX: saxitoxin, GTX: gonyautoxin, dc-: decarbamoyl-

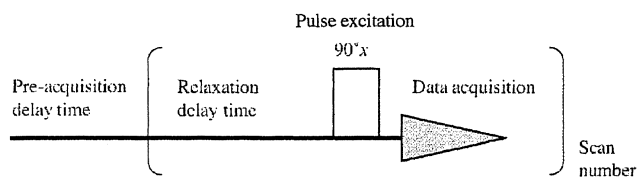


Figure 2. Single pulse sequence used in the quantitative NMR method

Table 1. Longitudinal relaxation delay times of protons in PSP toxins and HDO

Compounds	Position	No. of H	δ (ppm)	T ₁ (sec)	Compounds	Position	No. of H	δ (ppm)	T ₁ (sec)
GTX5	5	1	4.77	1.64	GTX6	5	1	4.84	2.05
	6	1	3.89	1.66		6	1	4.16	1.66
	11	2	2.32-2.48	1.73		11	2	2.33-2.48	1.72
	13	1	4.41	0.49		13	1	4.54	0.51
	13	1	4.13	0.45		13	1	4.28	0.49
	10	1	3.81	0.53		10	1	3.79	0.50
dcGTX2/3	10	1	3.62	0.55		10	1	3.63	0.53
	10	1	3.98	0.50	HDO		1	4.87	7.03
	6, 13, 10	4	3.55-3.68	0.98	CHD ₂ COOD		1	2.08	9.55

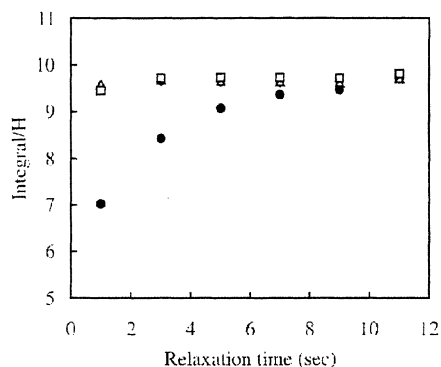


Figure 3. Effect of relaxation delay time on integral value of arginine protons.

L-arginine was measured in 4.3% CD₃COOD/D₂O at acquisition time of 1.8 sec, pulse angle of 90°, and scan number of 64. Symbols ●, ◇, △ and □ shows α, β, γ and δ protons of L-arginine, respectively.

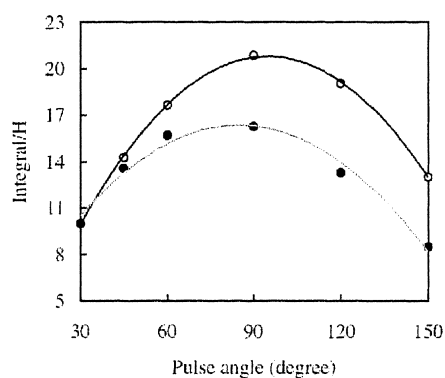


Figure 4. Effect of pulse angle on integral value of arginine protons.

L-arginine was measured at acquisition time of 1.8 sec, and scan number of 64. Symbols ● and ○ show *tert*-butanol and CHD₂COOD signal in *tert*-butanol/CD₃COOD/D₂O, respectively.

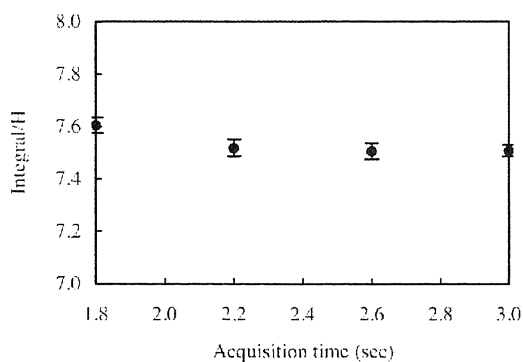


Figure 5. Effect of acquisition time on integral value of arginine protons.

L-arginine was measured in 4.3% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ at pulse angle of 90° , relaxation delay time of 11 sec and scan number of 64.

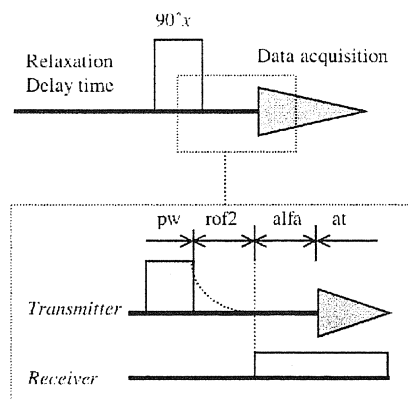


Figure 6. Minimizing baseline fluctuation by optimizing the time between pulse and data acquisition.

pw: pulse width, rof2: receiver gating time following pulse, alfa: delay before acquisition, at: acquisition time

Table 2. Parameters used for the quantitative NMR measurement with internal standard

Parameters	Values	Parameters	Values	Parameters	Values
Frequency (MHz)	600	Receiver gain	40	Filter	digital
Spectral width (Hz)	9000	Pulse width (μsec)	9.4	Number of data points	39k
Acquisition time (sec)	2.2	Pulse angle	90°	Number of Frequency-points	65k
Scan number (times)	64	Spin rotation	not used	Processing	Linear prediction
Relaxation delay (sec)	11	Temperature ($^\circ\text{C}$)	20	rof2/alfa*	optimization

*: rof2; receiver gating time following pulse, alfa; delay before acquisition

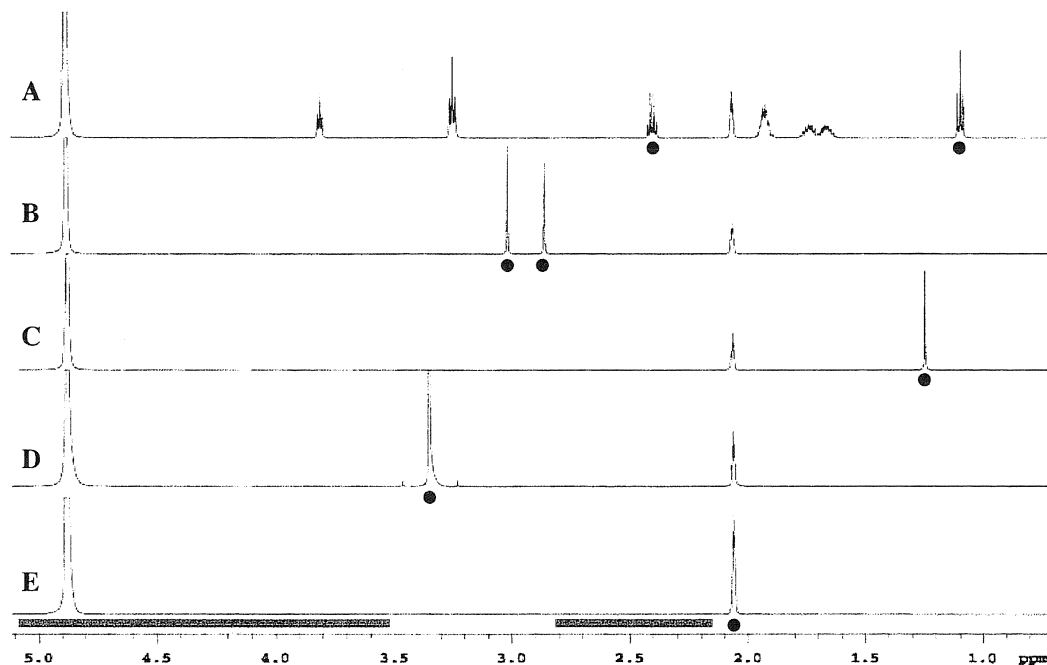


Figure 7. Comparison of chemical shifts of reference materials

Compounds tested for internal standard were propionic acid (A), dimethylformamide (DMF, B), *tert*-butanol (C) methanol (D), and CHD_2COOD (E) in 4.3% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$. Spectrum A contained L-arginine. Solid circles show signals of reference materials. Gray bold line on the scale shows the region where signals of PSP toxins will appear.

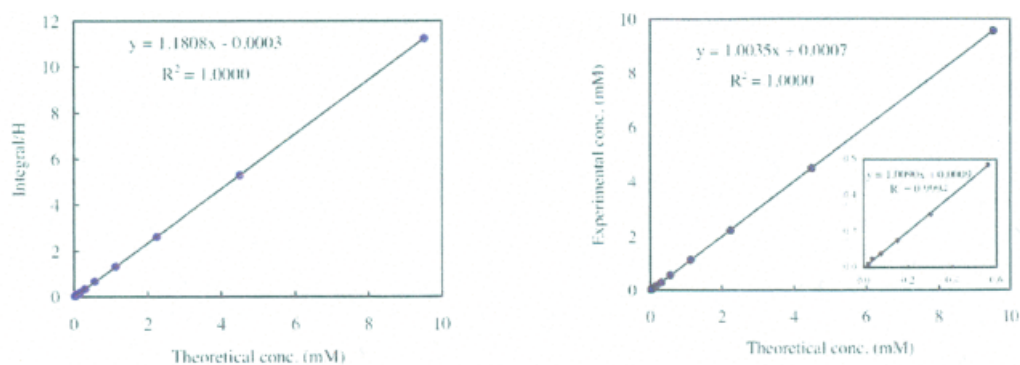


Figure 8. Linearity (left) and accuracy (right) in the quantitative NMR method using 0.85 mM of *tert*-butanol as reference.

L-arginine was tested in concentration from 0.02 mM to 9.53 mM.

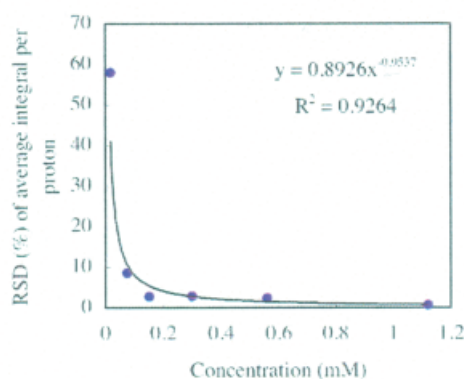


Figure 9. Quantitation limit of the NMR method.

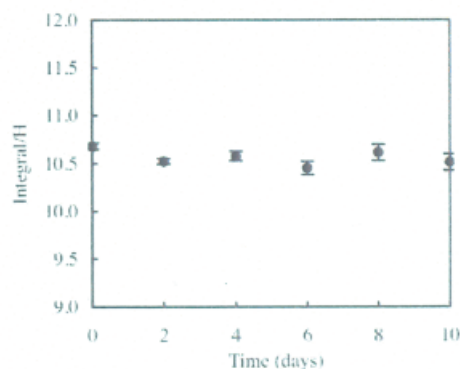


Figure 10. Repeatability of the quantitative NMR method in short period.

L-arginine (9.24 mM) was measured in 4.3% CD₃COOD/D₂O.

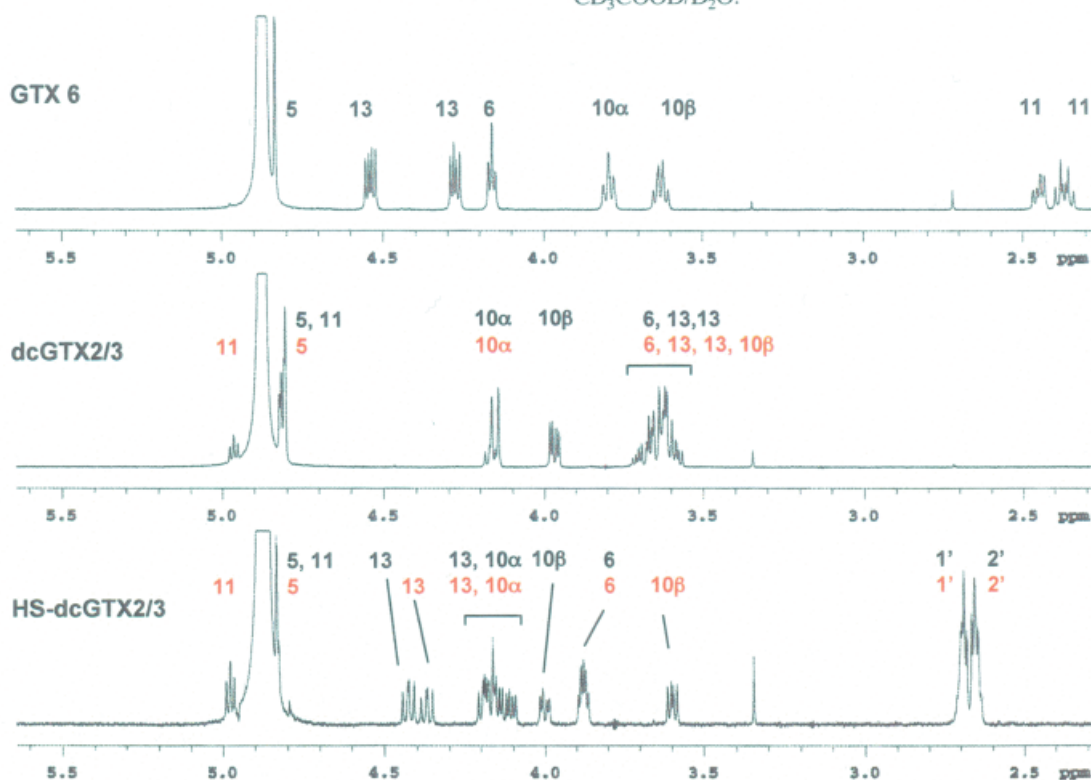


Figure 11. NMR spectra of PSP toxins and the derivatives for the quantitative NMR analysis. Black and red values indicate α and β epimer, respectively.

Table 3. Quantitative NMR analyses of natural and derivatized PSP toxins.

Position	GTX5	GTX6	dcGTX2 and dcGTX3		
			Mixture	dcGTX2	dcGTX3
5	-	-	-	-	-
6	3.62	3.49	5.17 [§]	-	-
13	3.62	3.35		-	-
13	3.62	3.38		-	-
10 α	3.57	3.40		-	1.43 [§]
10 β	3.61	3.45		3.65	-
Average	3.61	3.41	-	-	-
Stdev	0.02	0.06	-	-	-
%rsd	0.60	1.64	-	-	-
Conc (mM)	3.07	2.90	-	3.10	1.22

Position	CET-STX	HS-dcSTX	HS-dcGTX2 and HS-dcGTX3		
			Mixture	HS-dcGTX2	HS-dcGTX3
5	-	-	-	-	-
6	1.79	5.48	1.33	-	-
13	1.86	5.62	1.29	0.58	0.71
13	1.80	5.43	1.32	-	-
10 α	1.75	5.48	-	-	-
10 β	1.78	5.63	1.35	0.60	0.75
1'	1.92	5.70	1.37	-	-
2'	1.91		-	-	-
Average	1.80	5.57	1.33	0.59	0.73
Stdev	0.04	0.11	0.03	0.01	0.03
%rsd	2.25	2.02	2.28	2.40	3.87
Conc (mM)	1.53	4.74	-	0.50	0.62

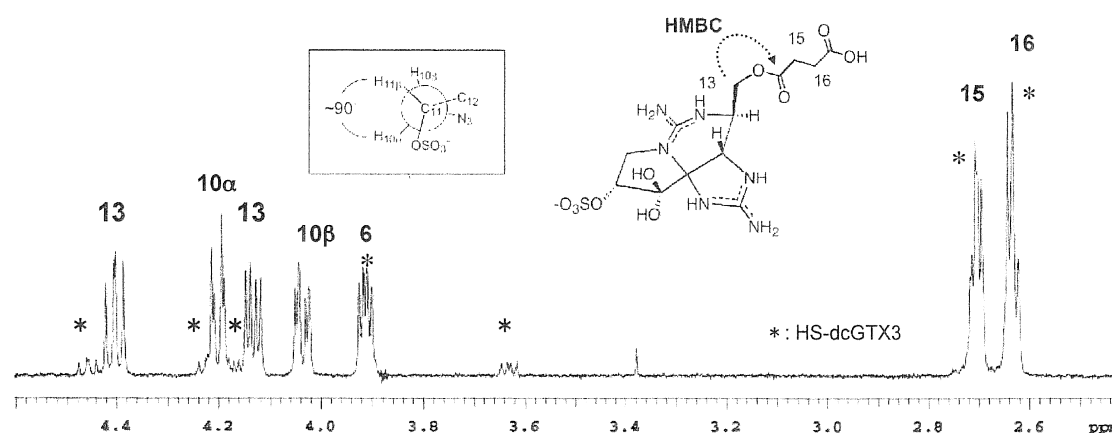
The value indicates integral value for the respective proton.

Either 0.85 mM or 0.87 mM of *tert*-butanol was used as reference.

¶: Total integral values for H-10, H-6 and H-13.

§: Value for H-10 α was calculated by subtracting from the integral (5.08) of H-10 α in both toxins in total to 3.65 of H-10 β in dcGTX2.

Abbreviation of the derivatives; CET-STX: 11-(2-(carboxyethylthio)-saxitoxin, HS-dcSTX: 13-*O*-hemisuccinyldecarbamoysaxitoxin, HS-dcGTX2/3: 13-*O*-hemisuccinyldecarbamoylegonyautoxin 2/3

Figure 12. Confirmation of the hemisuccinyl derivative of dcGTX2 as a α -epimer

(*tert*-butanol/ $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ at 600 MHz)

Only small amount of HS-dcGTX3 was contained.

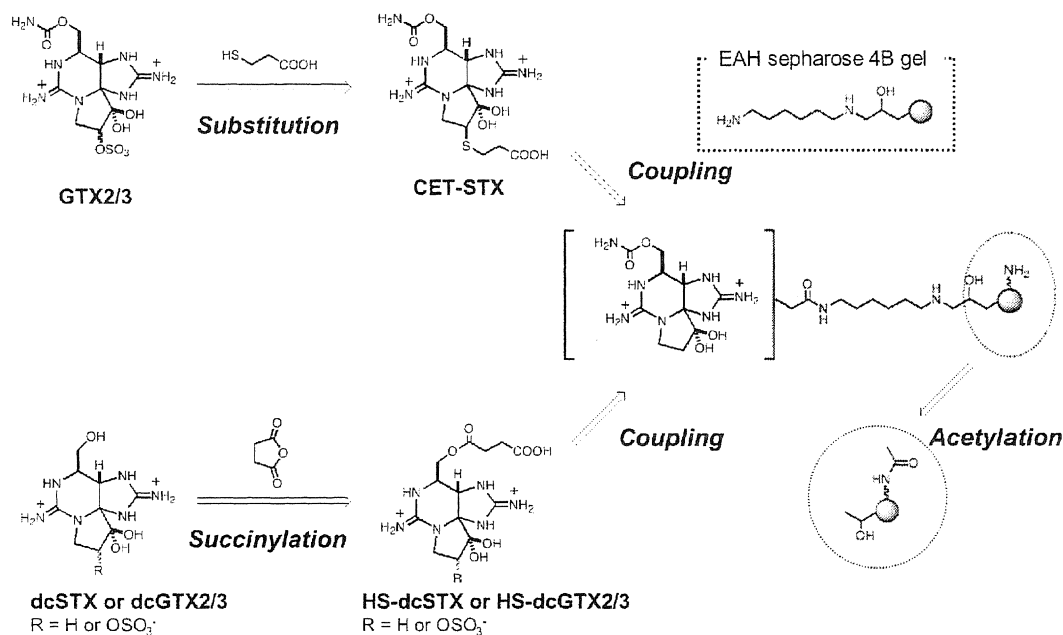


Figure 13. Strategy for the preparation of PSP toxin-conjugated affinity gels

Table 4. Yields of coupling reaction of CET-STX and EAH sepharose 4B

Entry	Solvent	pH	Reagents	Temp (°C)	Yield (%)
1	H ₂ O	6.0	EDC	r.t.	10
2	H ₂ O	6.0	EDC/HOBt	r.t.	< 1
3	H ₂ O	6.0	EDC/NHS	r.t.	< 1
4	MES	6.5	EDC/NHS	r.t.	15
5	MES	6.5	EDC	r.t.	92

Reaction was carried out for 20 to 24 hrs.
The derivative (200 nmol) was used.

Table 5. Yields of coupling reaction of HS-dcSTX and EAH sepharose 4B

Entry	Solvent	pH	Reagents	Temp (°C)	Yield (%)
1	MES	6.5	EDC/NHS	4	62-70
2	MES	6.5	EDC	4	1
3	MES	5.0	EDC/NHS	4	< 1
4	MES	5.0	EDC	4	0

Reaction was carried out for 20 to 24 hrs.
The derivative (200 nmol) was used.

Table 6. Coupling reaction of HS-dcGTX2/3 and EAH sepharose 4B

Entry	Solvent	pH	Reagents	Temp (°C)	Yield (%)
1	MES	6.0	EDC/NHS	4	35
2	MES	6.5	EDC/NHS	r.t.	8
3	MES	6.5	EDC	r.t.	2
4	MES	6.5	EDC/NHS	4	33
5	MOPSO	7.0	EDC/NHS	4	18
6	HEPES	7.5	EDC/NHS	4	7

Reaction was carried out for 20 to 24 hrs.
The derivative (100 nmol) was used.

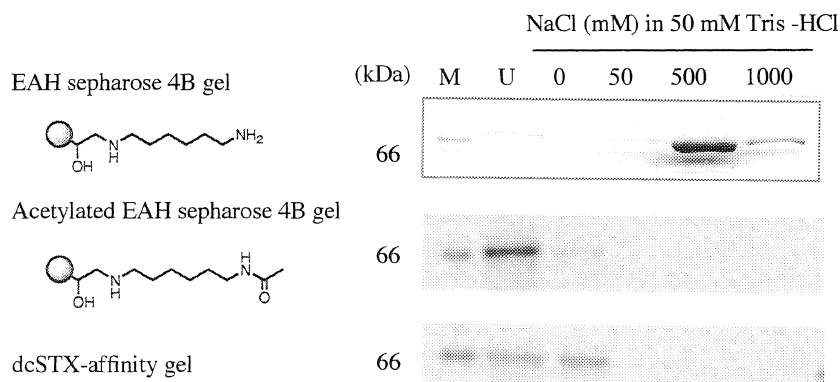


Figure 14. Effect of *N*-acetylation of the remaining amino group on acidic protein.

7.5 % polyacrylamide gel, CBB staining, 200 V constant.

M: marker, U: unbound fraction

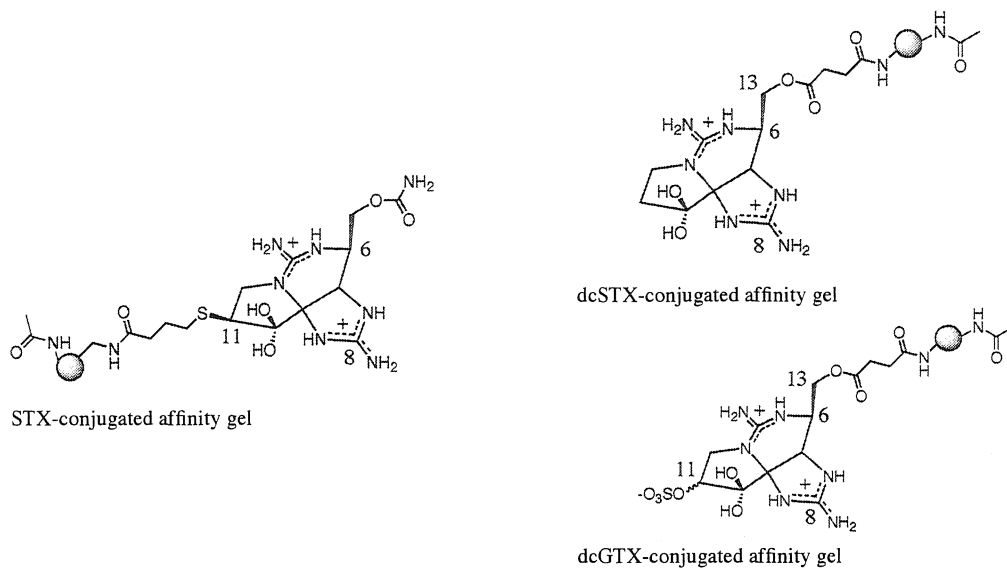


Figure 15. PSP toxin-conjugated affinity gels prepared by chemical derivatization.

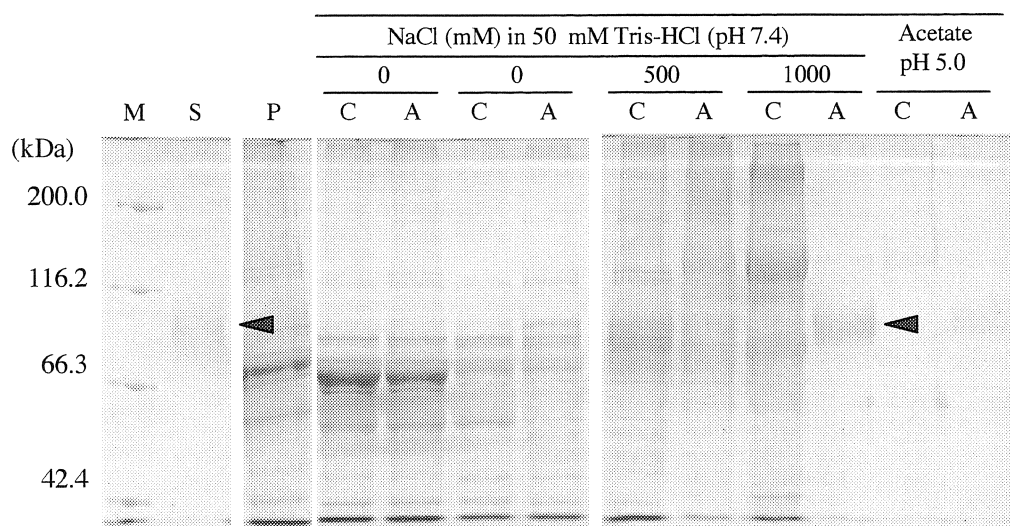


Figure 16. SDS-PAGE of fractions from the affinity gel with or without STX.

Acrylamide gel (7.5%) was stained with CBB. Pufferfish plasma was eluted with 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 containing increasing NaCl and finally 50 mM acetate at pH 5.0 as mobile phases at a flow rate of 0.2 ml/min.

M : Marker, S : pure pSTBP, P : pufferfish plasma, A : eluates from STX-affinity gel, C : eluates from control.

論文審査結果要旨

渦鞭毛藻によって生産され、二枚貝に移行蓄積して食中毒の原因となる麻痺性貝毒は食品衛生、産業上大きな問題である。そのため、化学分析法等新しい手法の開発が求められているが、その基盤となる精製毒の濃度決定は極めて困難である。また、二枚貝による蓄積機構等の解明も進んでおらず、これを打破するためにまったく新しい手法の開発が求められている。

このような状況下、本研究は、核磁気共鳴装置を利用して非破壊的、簡便かつ正確に麻痺性貝毒の濃度を決定する方法を開発している。そこでは待ち時間、パルス幅、データ取得時間、積算回数等、データ取得に関わる要素とその後のデータ加工の条件とに分けて、測定条件を着実に最適化し、また、内部標準を検討した結果 *tert*-ブタノールを採用することにより、十分な分析精度と迅速さをもって濃度決定が可能であることを示している。また、この手法を活用して世界で初めて gonyautoxin-6 の標準液を調製するとともに、その比毒性を明らかにしている。

さらに、本研究では、まったくユニークな発想のもとに麻痺性貝毒の合成誘導体を用いた新規研究素材の開発を目指している。まず、麻痺性貝毒を化学的に変換して C11 位と C13 位を介してカルボン酸を高収率で導入することにより、鍵化合物 2 種を調製した。完全水系でこれらカルボン酸導入誘導体を固相担体に結合させることにより、毒と親和性をもつ生体高分子を探索するためのアフィニティーゲルの合成に成功した。既知の saxitoxin 結合タンパク質を使って、これらがアフィニティーゲルとして機能することを実証している。

加えるに、これら鍵化合物を使って人工抗原を合成し、また、ELISA 法のための酵素結合毒の調製することによって、この化合物群が新規研究素材の合成にすぐれたポテンシャルをもつことを実証している。以上のように、渡邊龍一による本研究の成果は、独創性に富み、かつ、本分野の将来の研究に大きく貢献するものである。審査員一同は、これを博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。